

膵臓同種移植におけるIL-10の生着延長効果と血管新生に及ぼす影響

著者	藤原 志津子
号	1563
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/21794

氏 名（本籍）	藤 ^{ふじ} 原 ^{わら} 志 ^し 津 ^づ 子 ^こ
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 6 3 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻
学 位 論 文 題 目	脾ラ島同種移植における IL-10 の生着延長効果と 血管新生に及ぼす影響
論文審査委員	（主 査） 教授 松 野 正 紀 教授 里 見 進 教授 佐 藤 靖 史

論文内容要旨

臓器移植の際には、Th1 を介した細胞性免疫応答が活性化されることが知られており、脾ランゲルハンス島移植においても移植片周囲の環境は Th1 優位であることが報告されている。IL-10 は Th2 細胞から産生され、Th1 細胞やマクロファージに抑制的に関与するサイトカインである。

本研究の目的は、IL-10 を用い、移植ラ島局所での免疫作用によるラ島生着延長誘導の可能性を評価することである。また同時に、移植ラ島の生着と拒絶反応を、マウス背部に作成した skinfold chamber を用い、生体顕微鏡観察システムにて直視下で経時的に観察し、新生血管に対する IL-10 の保護作用を経時的に検討した。

方 法

ドナーには、12-14 週齢雄性 BALB/c マウスと 6-8 週齢雄性 ICR マウスを用い、レシピエントには、6 週齢雄性 BALB/c マウスを使用した。コラゲナーゼ消化、デキストラン濃度勾配法に準じてマウス脾ランゲルハンス島を採取した。

同種移植の系における IL-10 の局所産生下での生着延長効果を観察するため、採取した ICR マウスのラ島の一部に、アデノウイルスをベクターとして IL-10 遺伝子を導入した。始めに、アデノウイルスによる遺伝子導入効率を検討し、アデノウイルス感染後の viability を検討した。導入後の IL-10 の産生と、インスリン産生を確認した。次に、in vivo において長期の細胞観察期間中容易にラ島の位置を同定するために、ラ島を蛍光色素で染色した。

これを、BALB/c mice の背側皮膚に作製した skinfold chamber 内へ移植し、3 日毎に経時的に蛍光顕微鏡下で観察し、ビデオシステムにて記録、解析した。同系移植モデルとして Balb/c mice のラ島を、同種移植モデルとして ICR mice のラ島 (IL-10 導入群、Lac-Z 導入群、無処置群) を、Balb/c mice へそれぞれ移植した。

観察終了後、skinfold chamber 部を切除して凍結標本とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を施行した。

結 果

Lac-Z によるアデノウイルスの導入効率は、10MOI で 1 時間接触させて 30%、6 時間で 40%、100MOI で 1 時間接触させて 50%、6 時間で 85% であった。viability は、非感染細胞で 90%、10MOI で 90%、100MOI で 70% と、アデノウイルスによる細胞毒性が MOI 依存性に認められ

たが、接触時間による差は認めなかった。IL-10 の産生量は、アデノウイルスの MOI と接触時間に依存性に増量していたが、インスリン産生量は、viability に比例していた。

移植後の観察では、同系移植モデルで移植 3 日目にラ島周囲に capillary sprout が出現し、6 日目より sprout 間の交通が認められるようになり、10 日目には新生血管が network を形成しラ島を栄養していた。同種移植モデルでは移植 3 日目にラ島周囲に capillary sprout が出現し sprout 間の交通を認めたものの、network の完成をみないまま、12 日目までに新生血管は狭小化し退縮した。しかし、IL-10 遺伝子を導入したラ島では自家移植と同様の経過で network を形成し、Lac-Z 遺伝子導入群が拒絶された 10 日目以後も良好な血流を保ち続けた。

生着延長が認められたラ島の周囲には、リンパ球の浸潤を認めなかった。

考 察

本実験ではラ島に対する拒絶反応を、skinfold chamber model を用いることにより移植早期から直視的、経時的に観察し得た。これまで、skinfold chamber を用いた免疫抑制下における血管新生形成過程の観察に関する報告はなく、新しい知見である。同系移植と同種移植を比較して経過をみると、血管新生が始まり血管内皮が増殖した後に拒絶が起きていることが判明したことから、血管内皮細胞がグラフトの拒絶反応において何らかの役割を演じていることが示唆される。一方、IL-10 導入豚ラ島では新生血管網が完成され、ラ島の形態も保たれていた。IL-10 が新生血管の形成過程を保護することにより、ラ島の生着を誘導している可能性が示唆された。IL-12 は IFN- γ を誘導し、MHC class I, II の発現を刺激し抗原提示を増強させるとともに IL-2 receptor の発現を誘導して CTL の増殖を刺激している。IL-10 はこれら IL-12 の作用に拮抗的に働き、CTL の誘導を阻害している。組織所見では、IL-10 導入豚ラ島周囲には、拒絶されたラ島周囲のようなリンパ球浸潤がみられず、この作用を支持していると考えられた。

移植早期のラ島局所の免疫環境を IL-10 を用いて制御することにより、移植早期の新生血管破壊の抑制と、移植ラ島の生着延長効果が得られることが判明した。

審 査 結 果 の 要 旨

臓器移植の際には、Th1 を介した細胞性免疫応答が活性化されることが知られており、脾ランゲルハンス島移植においても移植片周囲の環境は Th1 優位であることが報告されている。

本研究は、Th2 細胞から産生され、Th1 細胞やマクロファージに抑制的に関与するサイトカインである IL-10 を用い、移植ラ島局所のみの免疫制御によるラ島生着延長誘導の可能性を評価し、また同時に、移植ラ島の生着と拒絶反応を、マウス背部に作成した skinfold chamber を用い、生体顕微鏡観察システムにて直視下で経時的に観察し、新生血管に対する IL-10 の保護作用を経時的に評価することを目的としている。

まず、著者は、ドナーから採取したラ島に、アデノウイルスをベクターとして IL-10 遺伝子を導入した。これを、レシピエントの背側皮膚に作製した skinfold chamber 内へ移植して 3 日毎に経時的に蛍光顕微鏡下で観察し、ビデオシステムにて記録、解析した。同種移植の系における IL-10 局所産生モデルと同系移植モデル、Lac-Z 移植モデルの新生血管形成過程を比較したところ、IL-10 遺伝子を導入したラ島では同系移植と同様の経過で network を形成し、Lac-Z 遺伝子導入群が拒絶された 10 日目以後も良好な血流を保ち続けるという結果を得た。

本研究ではラ島に対する拒絶反応を、skinfold chamber model を用いることにより移植早期から直視的、経時的に観察し得たが、これまで、skinfold chamber を用いた免疫抑制下における血管新生形成過程の観察に関する報告はなく、新しい知見である。血管新生が始まり血管内皮が増殖した後に拒絶が起きていることが観察されたことから、血管内皮細胞がグラフトの拒絶反応において何らかの役割を演じていることが示唆され、一方、本研究によって IL-10 導入脾ラ島では新生血管網が完成され、ラ島の形態も保たれていることから、IL-10 が新生血管の形成過程を保護することにより、ラ島の生着を誘導している可能性が強く示唆された。

以上より、移植早期のラ島局所の免疫環境を IL-10 を用いて制御することにより、移植早期の新生血管破壊の抑制と、移植ラ島の生着延長効果が得られることを、直視下で、かつ経時的に評価し得た本研究は、新しい知見にとみ、その意義も深く、十分に学位に値するものと考えられる。